

TRANSMITTAL SHEET

EXPRESS MAIL No.: EL 138 361 219 US

Deposited: June 30, 2000

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service Express mail under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231

/ Ruth Montalvo

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Date: June 30, 2000

Docket No: GK-ZEI-3092

Sir:

Transmitted herewith for filing is the Patent Application (37 CFR 1.53(b)) in the name(s) of:
Rolf WOLLESCHEFSKY, Thomas FEURER and Roland SAUERBREY

10651 U.S. PTO
09/607643
06/30/00

FOR: **ARRANGEMENT FOR OPTIMIZING THE PULSE SHAPE IN A LASER SCANNING MICROSCOPE** (*Anordnung zur Optimierung der Pulsform in einem Laser-Scanning Mikroskop*)

ENCLOSED ARE:

APPLICATION FILED IN THE GERMAN LANGUAGE

- (X) 4 pages of Specification, 3 page(s) of Claims (# of claims 23) & Abstract;
- (X) Figs. 1 - 3 / Three (3) sheet(s) of Drawings;
- () Declaration and Power of Attorney; (TO FOLLOW)
- () Assignment to: *Carl Zeiss Jena GmbH and PTO-1619A*; (TO FOLLOW)
- () Certified copy(ies) of *German Patent Appli. No. 199 30 532.3 filed June 30, 1999*, the priority(ies) of which is(are) claimed under 35 USC 119; (TO FOLLOW)
- () Verified Statement to establish Small Entity Status (37 CFR 1.9 & 1.27);
- () Information Disclosure Statement, PTO-1449 and reference(s);
- (X) Preliminary Amendment (Claims 23/2).

THE FILING FEE HAS BEEN CALCULATED AS SHOWN BELOW:

| | Claims filed | | Extra | SMALL \$ 345.00 | LARGE \$ 690.00 | AMOUNT \$ 690.00 |
|---|-----------------|----------|-------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Total Claims | 23 | Minus 20 | 3 | x \$ 9.00 | x \$ 18.00 | \$ 54.00 |
| Independent | 2 | Minus 03 | 0 | x \$ 39.00 | x \$ 78.00 | \$.00 |
| () Multiple dependent claim fee | | | | + \$ 130.00 | + \$ 260.00 | \$.00 |
| (X) Non-English specification 37 CFR 1.17(k) fee (+ \$130.00) | | | | | | \$ 130.00 |
| CHECK ENCLOSED: | | | | | | \$ 874.00 |

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees associated with the filing of this application but not limited to:

- (X) Any patent application processing fees under 37 CFR 1.17
- (X) Any filing fees under 37 CFR 1.16 for the presentation of extra claims

and any other fees required with this submission or to credit any overpayment to Deposit Account No. 13-0025.

Respectfully submitted

MM:ram


Mark Montague - Reg. No. 36,612

EXPRESS MAIL mailing label No. EL 138 361 219 US Date of Deposit June 30, 2000

I hereby certify that this paper or fee is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is address to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.



Ruth Montalvo

30 June 00

Date

Docket No.: GK-ZEI-3092

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s) : Ralf Wolleschensky, et al
Serial No. : Not yet assigned
Filed : Concurrently herewith
For : ARRANGEMENT FOR OPTIMIZING THE PULSE SHAPE IN A
LASER SCANNING MICROSCOPE

PRELIMINARY AMENDMENT

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please amend the above-identified application, filed simultaneously herewith,
as follows:

IN THE CLAIMS

Cancel claim 19 and add new claim 24, reading as follows:

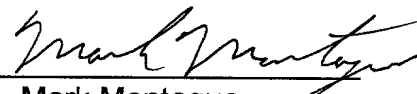
—24. A device for coupling a short-pulse laser into a microscope beam pathway, substantially as heretofore described, with reference to and as illustrated in the accompanying drawings.--

REMARKS

Claims 19 has been cancelled and new claim 24 has been added.

An early and favorable action on the merits is respectfully requested.

Respectfully submitted,

By: 
Mark Montague
Reg. No. 36,612

June 30, 2000
McAULAY NISSEN GOLDBERG & KIEL, LLP
261 Madison Avenue
New York, New York 10016
Tel. (212) 986-4090
GHK:jl

Anordnung zur Optimierung der Pulsform in einem Laser-Scanning Mikroskop

In der Mikroskopie zur Untersuchung von z.B. biologischen Präparaten werden heutzutage immer häufiger nichtlineare Kontraste, wie die Zwei-Photonen Absorption oder die Erzeugung der zweiten Harmonischen (SHG) eingesetzt. Um die zur Anregung von nichtlinearen Effekten nötige Energie bereitzustellen, ist es vorteilhaft Kurzpulslaser einzusetzen. Dabei sollte die Pulsspitzenleistung möglichst groß und damit die Pulslänge am Ort der Probe möglichst klein sein, um eine gleichzeitiger Schädigung der Präparate zu verhindern. Kurzpulslaser liefern beispielsweise Lichtimpulse mit einer Pulslänge von einigen 10fs bei einer Repetitionsrate von mehreren 10 MHz. Sie haben dadurch den Vorteil äußerst hohe Pulsspitzenenergien bei gleichzeitig geringer mittlerer Leistung zu emittieren.

Nachteilig ist, daß sich die kurzen Pulse auf dem Weg durch das Mikroskop zur Probe durch die Gruppengeschwindigkeitsdispersion (GVD) verändern – im Normalfall werden sie länger.

Zur Kompensation der Pulsverlängerung wurden entsprechende Anordnungen (Prechirp-Einrichtungen) vorgeschlagen (DE 19622353).

In DE 19733193 sind weiterhin apaptive Optiken vorgesehen.

Die beschriebenen Vorrichtungen sind zur Kompensation der Dispersion 2. Ordnung geeignet.

In den z.B. biologischen Präparaten ist jedoch mit nicht vorher bestimmbar Dispersionen höherer Ordnungen zu rechnen. Weiterhin treten in den optischen Komponenten in einem Mikroskop Dispersionen höherer Ordnung auf. Somit ist es mit den herkömmlichen Techniken nicht möglich, optimale Bedingungen zur Anregung der nichtlinearen Kontraste schaffen.

In konventionellen Fluoreszenzmikroskopie werden verschiedene Farbstoffe zur spezifischen Markierung von biologischen Präparaten eingesetzt. Diese Farbstoffe werden anschließend mit unterschiedlichen Lichtwellenlängen angeregt. Durch den Einsatz der Multiphotonen-Anregung erfolgt bei solchen Präparaten meist eine simultane Anregung der verschiedenen Farbstoffe. Dies ist einerseits ein Vorteil, da man nur noch eine Lichtwellenlänge zur Anregung benötigt. Andererseits ist es von

Nachteil, wenn sich die Emissionswellenlängenbänder der einzelnen Farbstoffe überlagern, da die Farbstoffe dann nicht mehr spektral getrennt werden können. Aufgabe der Erfindung ist die Beseitigung der beschriebenen Nachteile.

Anordnung:

Ein Blockschaltbild des bevorzugten Aufbaus ist in Fig. 1 dargestellt.

Ausgehend vom Kurzpuls laser KL gelangen die Lichtimpulse in den Pulsformer PF. Dieser ist schematisch in Fig. 2a gezeigt. Im Pulsformer PF wird der einfallende Strahl beam in in einem ersten dispersiven Element (1) bestehend z.B. aus einem Gitter oder Prismen die spektralen Komponenten der Lichtpulse räumlich aufgespalten. Anschließend wird mit Hilfe einer achromatisch korrigierten Linse oder Linsengruppe L1 (Fig. 2) eine Fourierebene erzeugt.

Diese Ebene (Brennebene) zeichnet sich dadurch aus, daß hier die einzelnen Spektralanteile der Lichtpulse räumlich separiert sind. Die Transformation in diese Ebene entspricht mathematisch gesehen einer Fouriertransformation. In diese Ebene wird ein räumlicher Licht-Modulator (2) (spatial light modulator – SLM) in Transmission eingesetzt. Dieser besteht im allgemeinen aus einer Matrix von helixartig oder parallel angeordneten, nematischen Flüssigkeitskristallen (z.B. SLM-S160/h, Firma: Jenoptik LOS). Durch eine entsprechende elektronische Beschaltung der einzelnen Punkte der Matrix kann die Transmission bzw. Phasenverschiebung der entsprechenden spektralen Komponente eingestellt werden. Anschließend wird die räumliche Trennung der spektralen Komponenten der Lichtpulse durch eine zweite identische Linse L2 und ein zweites dem ersten identisches dispersives Element (3) aufgehoben - beam out. Dieser Vorgang entspricht der Rücktransformation in den Zeitbereich. Mit Hilfe der Phasen- bzw. Amplitudenmodulation kann somit das zeitliche Verhalten der Lichtimpulse gesteuert werden. Die Anordnung aus 2 Gittern und 2 Linsen ist in der Literatur unter der Bezeichnung $4f$ – Anordnung bekannt.

Eine vereinfachte Anordnung für den Pulsformer ist in Fig. 2b aufgeführt. Hier ist gleich nach dem Modulator (2) ein Spiegel S angeordnet, so daß die Strahlung in sich zurück mit einem kleinen Höhenversatz oder unter einem kleinem Winkel in sich zurück läuft. Diese Anordnung kommt zum einen mit weniger optischen Komponenten aus, zum

anderen durchlaufen die Lichtpulse hier zweimal den Modulator (2), so daß sich die Größe der Phasen- / Amplitudenmodulation verdoppelt.

In Fig.3 ist die dispersive Aufspaltung und Zusammenführung eines roten Anteils r und eines blauen Anteils b unter Passieren des Manipulators 2 sowie der Wellenlängenverlauf entlang einer Richtung X auf dem Manipulator 2 schematisch dargestellt

Nachdem im Pulsformer das zeitliche Verhalten verändert werden kann gelangen die Lichtpulse über entsprechende optische Komponenten über das Mikroskop M und das Objektiv O in die Probe P. In der Probe P wird aufgrund der starken Fokussierung durch das Objektiv und der hohen Pulsspitzenleistung der Lichtpulse ein nichtlinearer Effekt angeregt. Dieser wird vom Detektor (4) registriert. Somit steht ein entsprechendes Meßsignal zur Verfügung, daß durch die elektronische Ansteuerung des Pulsformers mittels der Regelung R optimiert werden kann.

Die Wirkungsweise der Regelung soll nun beispielhaft anhand der Erzeugung eines Zwei-Photonen-Fluoreszenzsignales beschrieben werden.

Das Zwei-Photonen-Fluoreszenzsignal (S) kann wie folgt beschrieben werden:

$$S \propto \frac{P_{avg}^2}{\tau^2 \cdot A^2}$$
, wobei P_{avg} die mittlere Leistung und τ die Pulslänge der Lichtpulse am Ort

der Probe sind. A steht für den Strahlquerschnitt am Ort der Probenwechselwirkung.

Aus der obigen Gleichung ist ersichtlich, daß das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal mit kleiner werdender Pulslänge und Strahlquerschnitt und größer werdender mittlerer Leistung wächst. In einem Mikroskop wird die Pulslänge durch folgende Faktoren beeinflusst, d.h. meist verlängert:

- Durch die Glasmaterialien aus denen die optischen Elemente im Mikroskop gefertigt sind. Eine Kompensation kann hier stationär erfolgen.
- Durch das Präparat an sich. Die Pulsverlängerung ist hier abhängig von der Eindringtiefe in das Präparat. Weiterhin wird die Pulsverbreiterung durch Dispersionen höherer Ordnung erzeugt. Deshalb muß hier die Kompensation für jede spektrale Komponente einzeln und in Echtzeit erfolgen.
- Durch die Änderung der Wellenlänge
- Durch die Änderung der mittleren Leistung.

Der Pulsformer PF und damit das zeitliche Verhalten der Lichtpulse wird deshalb in Abhängigkeit von den o.g. Größen durch die Regelung in Echtzeit eingestellt, wobei als Meßgröße das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal fungiert. Durch den Pulsformer wird im wesentlichen die Pulslänge und die mittlere Leistung am Ort der Probenwechselwirkung optimiert.

Weiterhin sind die Wechselwirkungsquerschnitte der verwendeten Farbstoffe abhängig von dem zeitlichen Verhalten der Lichtpulse. Somit ist es möglich das Fluoreszenzsignal für einzelne Farbstoffe zu optimieren, wobei die Fluoreszenz anderer Farbstoffe gleichzeitig unterdrückt wird. Dies ist in der Literatur unter dem Begriff der kohärenten Kontrolle bekannt. Man hat also die Möglichkeit durch die Rückkopplung der Meßgröße (hier das Zweiphotonen-Fluoreszenzsignal) das zeitliche Verhalten der Lichtpulse durch Phasen- oder Amplitudenmodulation so einzustellen, daß die entsprechende Meßgröße optimiert wird.

Ansprüche:

1.
Vorrichtung zur Einkopplung eines Kurzpulslasers in einen mikroskopischen Strahlengang, wobei die spektralen Komponenten der Laserstrahlung mit Hilfe eines dispersiven Elementes (1) räumlich separiert, die einzelnen spektralen Komponenten manipuliert und anschließend wieder mit Hilfe eines weiteren dispersiven Elementes (3) räumlich überlagert werden.
2.
Vorrichtung zur Einkopplung eines Kurzpulslasers in einen mikroskopischen Strahlengang nach Anspruch 1, wobei die spektralen Komponenten der Laserstrahlung mit Hilfe eines dispersiven Elementes (1) räumlich separiert, in der Fourierebene/ Brennebene eines Abbildungselements Komponenten manipuliert (Manipulator 2) und anschließend wieder mit Hilfe eines weiteren dispersiven Elementes (3) räumlich überlagert werden.
3.
Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die spektralen Komponenten nach der Manipulation (2) an einem Spiegel reflektiert werden und mit Hilfe des dispersiven Elementes (1) wieder überlagert werden.
4.
Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Mikroskop ein Laser-Scanning Mikroskop ist.
5.
Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Mikroskop zur Untersuchung von nichtlinearen Kontrastverfahren eingesetzt wird.
6.
Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei als dispersives Element Prismen oder Gittern eingesetzt werden.
7.
Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Manipulator (2) eine Amplitudenmodulation der spektralen Komponenten erzeugt.

8.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Manipulator (2) eine Phasenmodulation der spektralen Komponenten erzeugt.

9.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der Vorrichtung zur Einkopplung eines Kurzpulslasers eine Monomode-Faser F nachgeschaltet ist.

10.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Monomode-Faser auch polarisationserhaltend wirkt.

11.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei als Manipulator (2) ein räumlicher Lichtmodulator (spatial light modulator – SLM) in der Fourierebene verwendet wird.

12.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch Rückkopplung des Meßsignals (4) der Manipulator (2) gezielt optimiert und damit das gewünschte Meßsignal eingestellt wird.

13.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) zur Kompensation der Dispersion höherer Ordnung eingesetzt wird.

14.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von der Mittenwellenlänge des Kurzpulslasers (6) optimiert wird.

15.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von dem verwendeten Objektiv optimiert wird.

16.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von der verwendeten mittleren Leistung optimiert wird.

17.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von der Eindringtiefe (5) in ein zu untersuchendes Präparat eingestellt und damit ein nichtlinear angeregtes Fluoreszenzsignal optimiert wird.

18.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mit Hilfe eines adaptiven Elementes AO zusätzlich die Pulsfront und die sphärischen Aberrationen optimiert werden.

19.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei durch die Rückkopplung die Phasenmodulation im Modulator (2) in Abhängigkeit von dem verwendeten Objektiv optimiert wird.

20.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels Phasen- und Amplitudenmodulation im Modulator (2) ein gezieltes Anregen von Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt.

21.

Vorrichtung nach 19, wobei dies selektiv erfolgt.

22.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels Phasen- und Amplitudenmodulation im Modulator (2) ein gezieltes Auslösen von Reaktionen (FRET, Uncaging) in Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt.

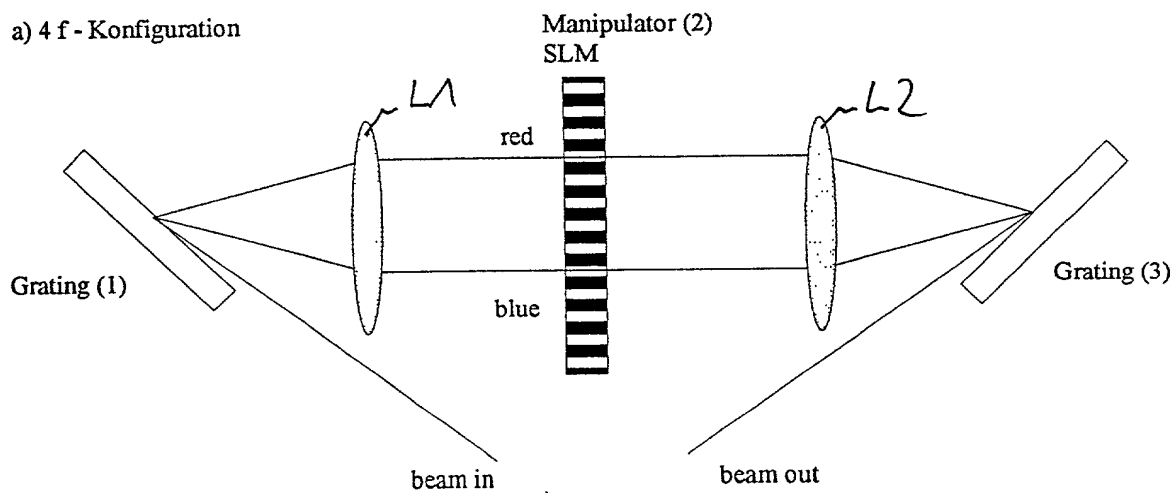
23.

Vorrichtung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels Phasen- und Amplitudenmodulation im Modulator (2) ein gezieltes Bleichen von Farbstoffen erfolgt.

Zusammenfassung

Vorrichtung zur Einkopplung eines Kurzpulslasers in einen mikroskopischen Strahlengang, wobei die spektralen Komponenten der Laserstrahlung mit Hilfe eines dispersiven Elementes räumlich separiert, die einzelnen spektralen Komponenten manipuliert und anschließend wieder mit Hilfe eines weiteren dispersiven Elementes räumlich überlagert werden.

a) 4 f - Konfiguration



b) gefaltete 4 f - Konfiguration

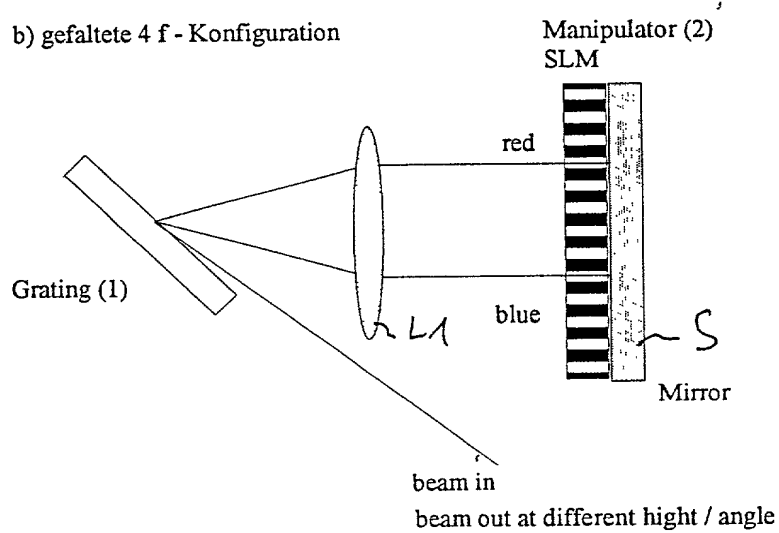


Fig. 2

a) 4 f - Konfiguration

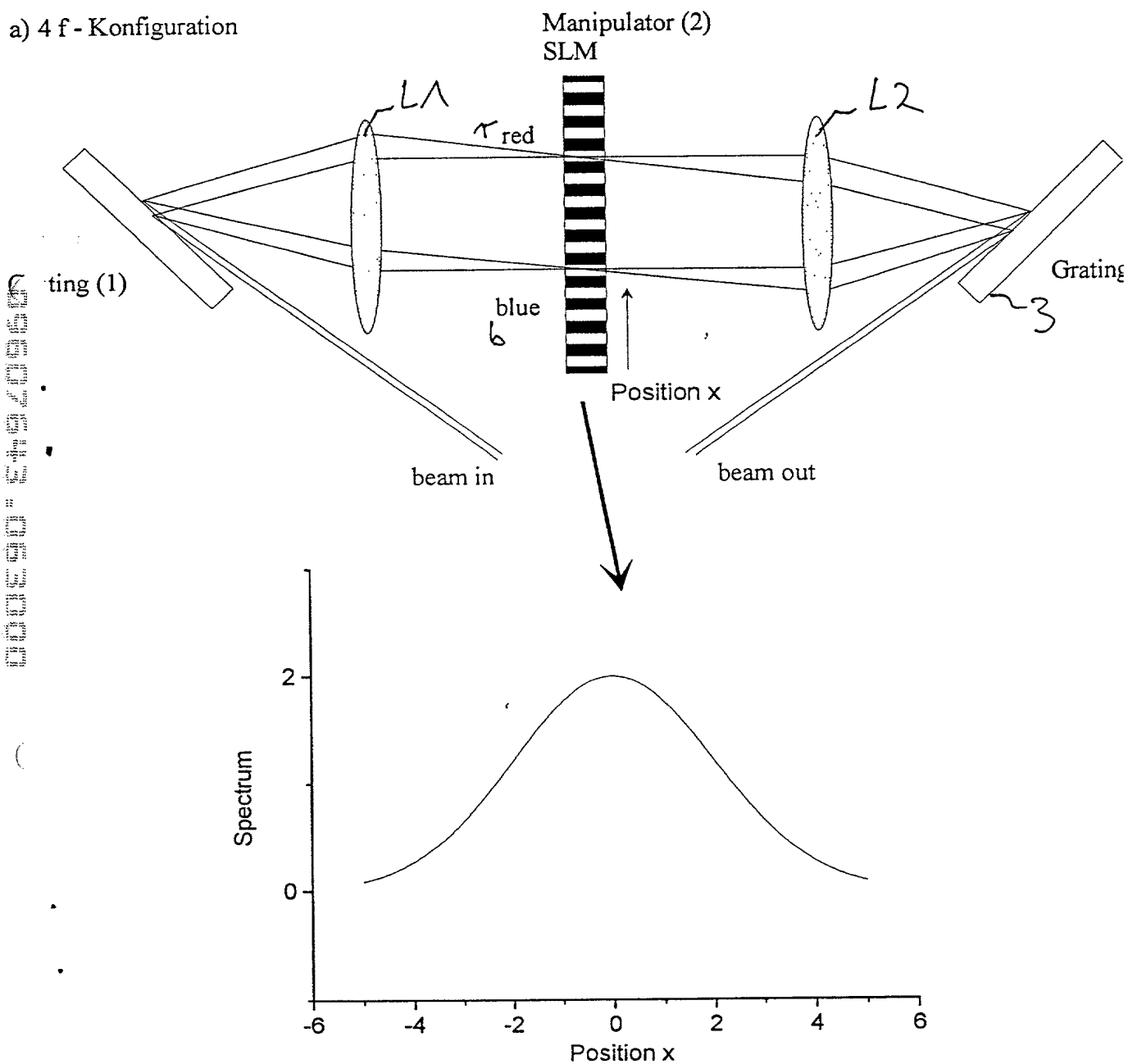


Fig.3